

MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT POUR L'ANALYSE NÉMATOLOGIQUE

PRINCIPE D'EXTRACTION — OBSERVATION

I. — INTRODUCTION

Excepté la maladie de l'anneau rouge, due à un nématode, *Rhadinaphelenchus cocophilus*, on ne connaît pas actuellement d'affections graves provoquées par les nématodes sur les cultures de palmiers à huile ou de cocotiers. Néanmoins, chaque fois qu'une anomalie encore inconnue apparaît dans des zones nouvelles de culture du palmier ou sur de nouvelles variétés de cocotiers, on est en droit de se demander si des nématodes sont ou non à l'origine des symptômes observés. Quelques techniques simples d'analyses nématologiques dans le sol et les racines permettent de faire un premier contrôle.

II. — MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL ET DE RACINES

Un échantillon de sol composite prélevé à l'aide d'une gouge ou d'un transplantoir sera constitué de 30 à 50 prises de 50 g de terre environ, effectuées dans les 15 à 20 premiers centimètres de sol dans la zone du système racinaire. De cet échantillon moyen de 2 à 3 kg parfaitement homogénéisé, on retiendra 200 à 300 g de terre pour analyse. Pour permettre la comparaison, deux échantillons seront prélevés dans la zone présentant de nombreux arbres malades et deux autres dans une zone où les arbres sont sains.

Des prélèvements peuvent être également effectués dans la rhizosphère des arbres sains et des arbres malades. On ne retiendra dans ce cas que les petites mottes de terre qui adhèrent aux racines lorsqu'on les arrache délicatement.

On recherchera les nématodes dans les horizons superficiels du sol exploités par le système racinaire des plantes de couverture. Si le terrain présente une grande hétérogénéité (nature du sol, zone humide, ...), on réalisera des prélèvements dans chacune des zones rencontrées sur la parcelle.

Des échantillons de 50 à 100 g de racines seront également analysés pour rechercher la présence de nématodes endoparasites. Les racines seront classées en plusieurs lots suivant leur taille et leur fonction (racines assimilatrices, racines primaires) et seront prélevées selon le même procédé sur des arbres sains et sur des arbres malades.

III. — MÉTHODES D'EXTRACTION DES NÉMATODES A PARTIR DU SOL

Parmi les nombreuses méthodes mises au point, on en retiendra trois qui peuvent être facilement reproduites sur les lieux mêmes d'une plantation industrielle.

III.1. — Méthode de l'entonnoir de Baermann.

La terre est mise dans un sac de tissu très fin (mousseline, linge à fromage ou gaze) et plongé doucement dans un entonnoir rempli d'eau. Le tube de l'entonnoir est muni d'un tuyau de caoutchouc souple, fermé avec une pince de Mohr. Les nématodes mobiles traversent en quelques heures ou en une nuit le tissu et s'accumulent dans le tuyau. Ils sont recueillis en laissant écouler rapidement quelques ml d'eau.

Une modification de cette technique consiste à déposer dans l'entonnoir un tamis (diamètre inférieur à celui de l'entonnoir) à mailles grossières, recouvert d'un linge fin ou d'un papier de soie (type Kleenex) ou d'une couche fine de coton hydrophile. Une couche mince de terre est alors déposée dans le tamis. Le niveau d'eau dans l'entonnoir doit affleurer le tamis de manière à humecter le sol. Le dispositif est maintenu en place pendant 24 à 48 h. On recueille ensuite les nématodes en laissant écouler quelques ml d'eau. On peut remplacer l'entonnoir par une cuve à développement photographique [Whitehead et Hemming, 1965] (Fig. 1).

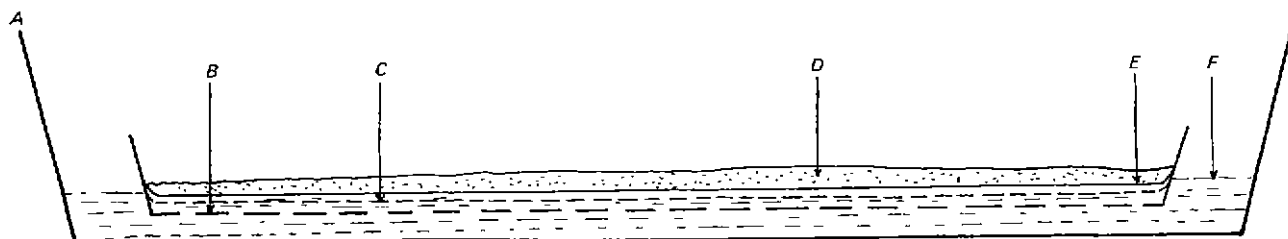


FIG. 1. — Dispositif d'extraction dans un plateau.

A : plateau ; B : tamis à larges mailles ; C : gaze de nylon ; E : papier de soie ; F : niveau d'eau ; D : fine couche de terre.

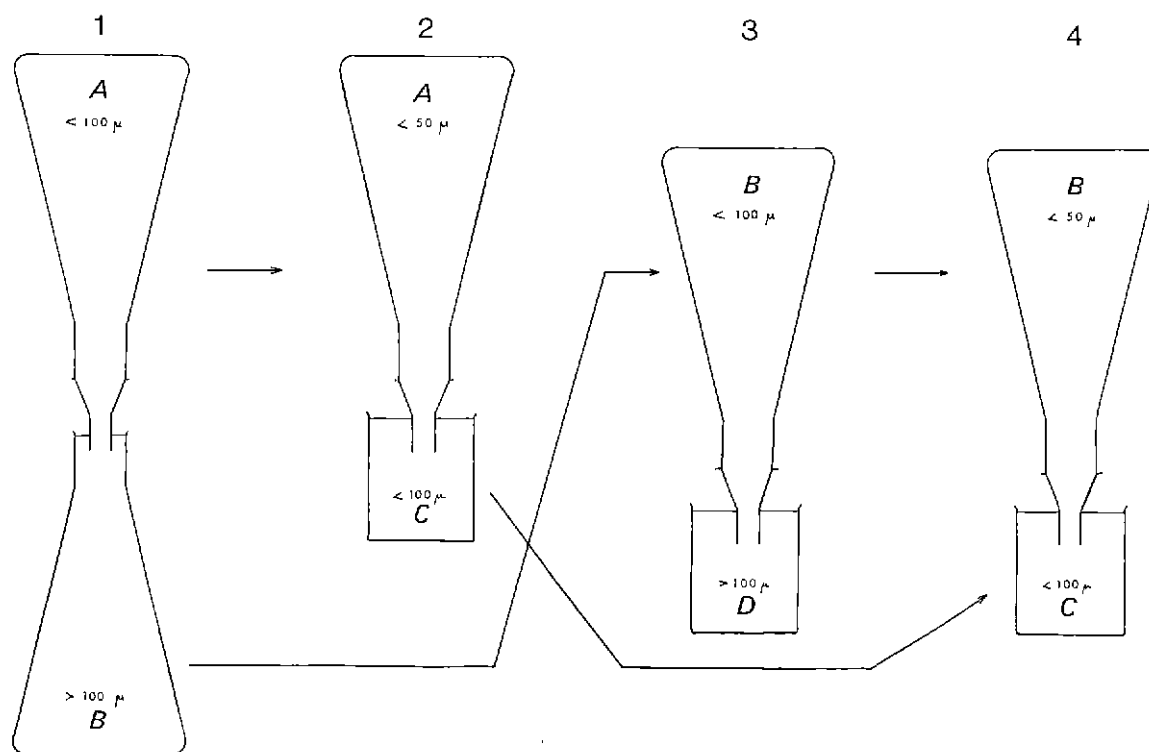


FIG. 2. — Différentes phases de sédimentation de la méthode des deux Erlenmeyers, d'après Seinhorst.

III.2. — Méthode de décantation-filtration [Cobb, 1918].

L'échantillon de sol est mélangé avec de l'eau dans un récipient. Après une forte agitation, on laisse reposer le récipient pendant quelques secondes puis on verse le surnageant sur une série de tamis superposés, de mailles allant de 1 mm à 50 μ (1 mm, 700 μ, 250 μ, 150 μ, 90 μ, 50 μ). Les plus gros fragments sont retenus par les tamis supérieurs. Si les tamis contiennent beaucoup de particules de sol, celles-ci sont reprises dans l'eau, agitées, puis le surnageant est versé sur le tamis supérieur. Ensuite, chaque tamis est rincé avec un léger courant d'eau, l'eau traversant le tamis étant à chaque fois recueillie par le tamis suivant. En fin d'expérience, le résidu sur chaque tamis est recueilli dans un béccher par lavage du tamis avec un courant d'eau. On laisse décanter le contenu du béccher pendant 2 h puis on verse l'eau en excès, le restant est réparti dans une série de bécchers qu'on laisse à nouveau reposer pour en réduire le volume.

III.3. — Méthode des deux Erlenmeyer [Seinhorst, 1955].

Cette méthode simple permet d'isoler les nématodes de taille moyenne, peu mobiles et qui ne traversent généralement pas les enveloppes fibreuses. Elle est basée sur les différences de vitesse de sédimentation existant entre les particules de sol et les nématodes. L'échantillon de terre (200 g environ) est introduit dans un Erlenmeyer « A » d'un litre, rempli d'eau. L'ouverture du flacon est muni d'un entonnoir qui s'adapte parfaitement sur l'Erlenmeyer et dont le tube a un diamètre de 12 mm environ. On agite très fortement l'Erlenmeyer, puis on le renverse pendant 10 mn sur un autre Erlenmeyer « B », d'un litre, également rempli d'eau. Pendant ce temps, les particules de sol de taille supérieure à 100 μ passent dans

« B », alors que la plupart des nématodes sont restés dans « A ». Par étapes successives d'agitation et de décantation de même durée (Fig. 2), on séparera les particules inférieures à 50 μ, comprises entre 50 μ et 100 μ et supérieures à 100 μ. En fin d'expérience, le contenu des fioles « A » et « B » est versé sur un tamis à mailles de 50 μ, le béccher C est examiné à tamis à mailles de 100 μ. Le béccher D ne contient pratiquement pas de nématodes et est éliminé. Les nématodes sont recueillis dans un béccher en faisant couler un léger courant d'eau sur les tamis.

IV. — MÉTHODES D'EXTRACTION A PARTIR DES RACINES

Les mêmes techniques que celles décrites précédemment sont applicables pour extraire les nématodes des racines. Les racines sont découpées en petits fragments de 0,5 cm de longueur et parfois fendues en deux lorsqu'elles sont d'un assez gros diamètre.

Les fragments sont déposés dans une boîte de Pétri contenant une petite quantité d'eau ; 24 h après, l'eau est recueillie et les racines sont rincées. L'eau de la boîte de Pétri et l'eau de rinçage sont examinées. On peut répéter l'opération pendant 7 jours consécutifs. Les racines peuvent aussi être déposées sur un tamis recouvert d'une mousseline, le tout contenu dans un récipient type cuvette à développement photographique.

Les racines découpées en fragments peuvent également être broyées dans l'eau avec un mixer pendant 10 à 15 s pour permettre une libération plus rapide de nématodes. Ensuite, les techniques de l'entonnoir ou de la décantation-filtration peuvent être utilisées pour isoler les nématodes.

V. — EXTRACTION DU *RHADINAPHELENCHUS COCOPHILUS* DES TISSUS DE COCOTIERS ATTEINTS DE L'ANNEAU ROUGE

Cette méthode a été mise au point par Fenwick, 1963. Les *Rhadinaphelenchus cocophilus* sont des nématodes extrêmement fins et mobiles, qui restent plusieurs heures en suspension dans l'eau. Des morceaux de stipe sont découpés en petits fragments puis broyés pendant 15 mn dans un mixer contenant de l'eau. La suspension est alors versée dans un Erlenmeyer de 2 l rempli d'eau. On laisse reposer le mélange pendant 30 mn puis on agite fortement et on renverse l'Erlenmeyer sur un récipient d'eau. On maintient la fiole dans cette position pendant 30 mn. Les fragments végétaux tombent dans le récipient. L'Erlenmeyer qui contient les nématodes est versé sur un tamis à mailles d'environ 50 μ , le liquide filtrant est recueilli quatre fois pour être versé à nouveau sur le même tamis. Le résidu restant sur le tamis renfermant les nématodes est rincé et recueilli dans un bécher.

VI. — CONCENTRATION DES NÉMATODES

Suivant la méthode utilisée, les nématodes sont obtenus dans des quantités d'eau assez importantes dont il est nécessaire de réduire le volume. Cette opération peut être effectuée en versant la suspension dans un cylindre de verre se terminant en forme d'entonnoir et muni d'un tube de caoutchouc obturé par une pince de Mohr (Fig. 3). Les nématodes s'accu-

mulent vers le bas du tube et peuvent être recueillis dans un faible volume d'eau. On peut à nouveau augmenter la concentration en utilisant un cylindre de diamètre plus petit. Il est également possible de verser la suspension de nématodes sur des tamis à mailles de 45 μ et de les recueillir dans une faible quantité d'eau. Enfin, on peut verser la suspension de nématodes dans un tube à fond arrondi, muni d'un bec verseur. Après une à deux heures de décantation, on verse délicatement le liquide surnageant (ou mieux on l'aspire), pour éviter toute turbulence. Les nématodes sont concentrés dans le culot.

Conservation.

Les extraits, pour les nématodes tropicaux, peuvent être conservés à 10 °C pendant plusieurs jours. On peut empêcher le développement des bactéries en ajoutant à 5 ml de suspension, 3 à 5 gouttes de sulfate de Streptomycine.

Pour une conservation de longue durée, il est nécessaire de fixer les nématodes. Ils doivent être mis d'abord dans une très petite goutte d'eau contenue dans un verre de montre. Puis, on ajoute très rapidement 3 à 4 ml d'un mélange constitué de formol et d'acide acétique (formol 10 ml, acide acétique glacial 1 ml, eau distillée 89 ml), chauffé à 100°. Il est extrêmement important de faire cette fixation à chaud, pour que les nématodes soient tués et fixés immédiatement.

Observation.

Les nématodes fixés ou non peuvent être observés au microscope stéréoscopique aux grossissements compris entre 10 et 100, en lumière transmise. Des verres de montre Syracuse sont particulièrement adaptés pour cette opération. A défaut, les verres de montre classiques conviennent également.

Il est possible aussi d'observer directement les tissus sous un stéréomicroscope. Dans ce cas, dilacérer les tissus (au préalable débarrassés des particules de terre) contenus dans une boîte de Pétri ouverte, dans l'eau. Les nématodes étant libérés plus ou moins rapidement, il est nécessaire d'examiner à nouveau l'échantillon deux ou trois heures après.

Les nématodes sont des organismes plus ou moins transparents, de forme allongée, fusiforme ou filiforme, non segmentée, sans appendice et de section circulaire ; la femelle de certains genres peut être sphérique ou piriforme. La taille des nématodes parasites des végétaux est généralement comprise entre 200 μ et 3 000 μ .

Mode d'expédition.

Lorsque l'examen se révèle positif, il est alors nécessaire d'expédier les échantillons fixés dans un laboratoire spécialisé qui pourra déterminer les espèces isolées.

Pour plus de précautions, on joindra quelques échantillons de sol et de racines, pris séparément dans des sacs en plastique et fermés pour éviter toute dessiccation, chacun d'eux enfermé dans un autre sac contenant une fiche sur laquelle doivent figurer les renseignements suivants :

— lieu et date de prélèvement,

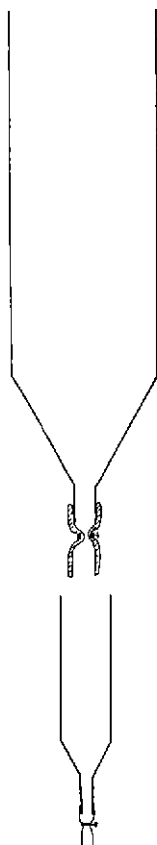


FIG. 3. — Cylindres pour concentrer les extraits de nématodes.

- nature et propriétés physiques du sol,
- antécédent cultural,
- humidité du sol,
- nature de la plante de couverture,
- fumures appliquées,
- symptômes observés avec description soignée de l'aspect des racines (présence de galles, de nécroses, etc...).

Les échantillons doivent être entreposés dans un local frais et être acheminés **rapidement** vers le laboratoire d'analyse.

CONCLUSIONS

Il existe des méthodes plus élaborées et plus précises pour extraire les nématodes, mais elles nécessitent des installations particulières. Les techniques décrites ici doivent permettre, par comparaison entre plusieurs échantillons prélevés dans des zones différentes, de déceler si des nématodes peuvent être à l'origine des anomalies observées et dans l'affirmative orienter l'agronome vers des recherches plus précises en collaboration avec un laboratoire de nématologie.

J.-L. RENARD

BIBLIOGRAPHIE

- FENWICK D. W. (1963). — Recovery of *Rhadinaphelenchus cocophilus* (Cobb, 1919) Goodey, 1960 from coconut tissues. *J. Helminth.*, **37**, p. 11-14.
- MURPHY P. W. (Ed.) (1962). — *Progress in Soil Zoology*, Butterworths, London, 398 p.
- SOUTHBY J. F. (Ed.) (1970). — *Laboratory Methods for work with Plant and Soil Nematodes*. Ministry of Agr., Fisheries and Food. *Techn. Bull.* 2, London.

